

萱草花粉中微管蛋白生物化学性质

廖俊杰^{1,2}，吴英杰³，阎隆飞¹

(1 中国农业大学生物学院植物生理生化国家开放重点实验室，北京 100094；2 广东轻工职业技术学院食品与生物工程系，广东 广州 510300；3 Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine New York, NY 10029)

摘要：微管（microtubule）是细胞骨架的重要成份，参与囊泡运输、信息传递等多种生命活动。我们从萱草花粉中纯化了植物微管蛋白，对其生物化学及生物物理学部分性质研究表明，纯化的微管蛋白经超离心法测定沉降系数为 6.2S，SDS-PAGE 分析，微管蛋白分子量为 56 kD、58 kD，凝胶扫描分析纯度为 93.7%。等电聚焦电泳测定等电点为 pI = 5.35。光谱学性质研究结果表明，最大紫外吸收峰为 280.8 nm，荧光光谱研究表明最大激发波长为 282 nm；此时的最大发射峰为 338 nm，圆二色光谱分析二级结构表明 - 螺旋占 27.24%，- 折叠占 24.48%，无规卷曲为 48.28%，呈典型球蛋白特征。

关键词：微管蛋白；微管；花粉；萱草

中图分类号：Q 945

文献标识码：A

文章编号：0253-2700(2006)04-425-04

Biochemical Characterization of the Pollen Tubulin from
Day Lily (*Hemerocallis fulva*, Liliaceae)

LIAO Jun-Jie^{1,2}，WU Ying-Jie^{3**}，YAN Lung-Fei¹

(1 State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China;
2 Department of Food and Bio-technology, Guangdong Light Industry Technologic College, Guangzhou 510300, China;
3 Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA)

Abstract: Eucaryotic cells contain a complex network of filamentous proteins collectively called the cytoskeleton, which participates in many cellular functions, including organelle motility and information transfer. Tubulins are one of the main components of the cell cytoskeleton. Tubulins of high purity were prepared from day lily pollen grains, and were biochemically and biophysically characterized in this study.

The molecular weight of α - and β -tubulin from day lily pollen is about 56 kD and 58 kD on SDS-PAGE, respectively. The purity is 93.7% by scanning analysis. The tubulin has a sedimentation coefficient of 6.2S and an isoelectric point of about 5.35. The maximum ultraviolet absorption is 280.8 nm. Fluorescence emission wave length of day lily tubulin is 338 nm by excitation at 282 nm. Circular dichroism (CD) spectrum analysis showed that the percentage of α -helix, β -sheet and random coil of day lily tubulin is 27.24%, 24.48% and 48.28%, respectively, indicating a typical feature of globulin.

Key words: Tubulin; Microtubule; Pollen; Day lily

微管（Microtubule）是真核生物细胞中普遍存在的空间网络结构。作为细胞骨架的主要成分，其组成的基本单位是微管蛋白（tubulin），

异二聚体，此异二聚体可头尾相连形成原丝，再由 13 根原丝组成微管。有关微管蛋白生物化学和药物学方面的研究绝大多数来自动物脑组

基金项目：国家自然科学基金资助（39730280）
通讯作者：Author for correspondence. E-mail: yyjjwu@yahoo.com
收稿日期：2006-01-16，2006-03-15 接受发表
作者简介：廖俊杰（1965-）男，硕士研究生，副研究员，主要从事植物细胞研究工作。E-mail: junjie33@gdgy.edu.cn

织，对植物微管蛋白生物化学方面的知识所知甚少，主要原因是植物微管蛋白分离纯化相当困难。我们利用萱草花粉为材料采用丙酮粉法、QAE-Sephadex A₅₀ 离子交换层析及 FPLC 技术作为主要分离纯化手段，建立了微管蛋白的纯化方法，并研究了纯化的微管蛋白生物化学及生物物理学部分性质。

1 材料与方法

1.1 材料

萱草 (*Hemerocallis fulva* L.) 花粉采自中国农业大学校园栽培的萱草，收集花药后置于 60 W 灯光下照射，待花粉囊开裂后用分样筛收集花粉，干燥后贮于 -80 °C 冰箱中。

QAE-Sephadex A₅₀，FPLC 整套设备及分离预装柱 Mono Q，均为 Pharmacia 产品，其它生化试剂均为 Sigma 公司产品及国产分析纯试剂。

1.2 方法

萱草花粉微管蛋白的制备 花粉经破碎，丙酮粉、硫酸铵分级盐析，QAE-Sephadex A₅₀ 及 FPLC-Mono Q 柱层析，最后得到纯化的花粉微管蛋白。

蛋白质浓度测定 采用 Bradford (1976) 方法，以牛血清白蛋白为标准蛋白，考马斯亮蓝 G250 为显色剂，岛津 UV—240 分光光度计测定。

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳 参照 Lamelli (1970) 方法，分离胶浓度为 10%，浓缩胶浓度为 4.8%，分子量标准为 Sigma 公司产品。蛋白质带用考马斯亮蓝 R250 法及银染色法染色 (Blum, 1987)。

聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳 采用 5% ~ 12.5% 梯度胶为分离胶，浓缩胶为 4.8%，显色方法同上。分子量标准为 Pharmacia 公司产品。

等电点 (PI) 测定 用 Bio-Rad Mini IEF 电泳槽 (Model) 测定等电点。电泳凝胶浓度为 5% T, 3% C。两性电解质为 Bio-Rad 公司的 Bio-Lyte 3 10 Ampholyte，凝胶支持膜为 Bio-Rad 公司专用膜。点样量 2 µg，聚焦用 Bio-Rad Model 3000xi 电源 100 V 15 min, 200 V 15 min, 450 V 60 min。蛋白带用银染色法显色，标准蛋白为 Pharmacia 公司产品。

沉降系数的测定 利用沉降速度法 (Shelanski, 1973) 测定沉降系数，转速 55 000 r min，温度 16 °C。紫外吸收光学扫描及 Schlieren 光学系统摄影记录。

圆二色谱测定 样品溶液 1 ml (蛋白含量 1 µg µl) 于 JASCO J500C 型圆二色谱仪上测定 200 nm ~ 250 nm 范围的远紫外 CD 谱，样品池光径为 1 mm，容量 800 µl。

紫外吸收光谱测定 微管蛋白紫外吸收光谱在 Beckman DU-7000 型分光光度计上测定，计算机自动绘图。

荧光光谱测定 纯化的微管蛋白样品溶液用日立 F-

4010 型荧光分光光度计测定激发光谱及发射光谱。

2 结果与分析

2.1 萱草花粉微管蛋白的生物化学性质

分子量的测定 将丙酮粉粗提液、硫酸铵分段盐析以及 QAE-Sephadex A₅₀ 柱、Mono Q 柱各步纯化所得样品经 SDS-PAGE 分析，可得到电泳纯的微管蛋白样品 (廖俊杰等, 2005)。微管蛋白存在 及 两个亚基，利用蛋白质电泳迁移率 R_f 与分子量对数成正比的关系测定微管蛋白 及 亚基的分子量分别为 56 kD 和 58 kD，比动物微管蛋白亚基的分子量略大。薄层扫描分析其纯度达到 93.7%，而且 、 两个亚基是等量存在的。

天然梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 分析 将纯化的花粉微管蛋白利用 5% ~ 12.5% 梯度凝胶电泳进行分析，结果见图 1。通常纯化的微管蛋白应当是 、 亚基以 1 : 1 二聚体存在，其分子量为 110 kD，但梯度电泳测得的分子量为 57 kD。推测其原因可能是由于微管蛋白巯基的氧化还原状态影响微管的聚合，当单体分子中有 2 个巯基被烷化或氧化形成硫醇盐而被封闭时，聚合状态就受阻。二聚体的稳定性是靠-S-S-键维持的，因此巯基还原剂可能促进二聚体解聚。所以这里测定的结果仍是单体的分子量。

等电点的测定 萱草花粉微管蛋白等电聚焦电泳图谱 (图 2)，其等电点为 5.35，表明它是一种酸性蛋白质，与动物微管蛋白相似。

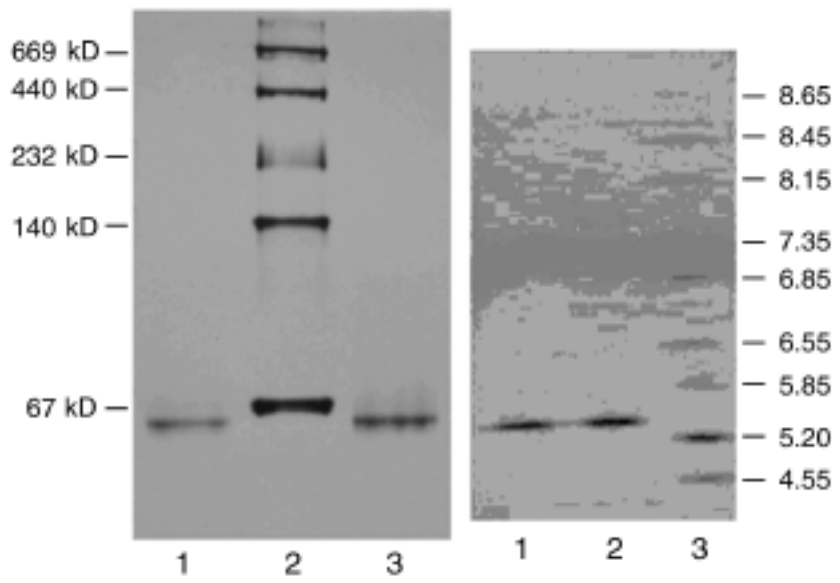


图 1 天然梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig . 1 Native-PAGE of purified
tubulin from pollen
lane 1, 3: purified day lily tubulin
lane 2: Standard markers

图 2 微管蛋白等电聚焦电泳
Fig . 2 IEF-PAGE of day lily
tubulin
lane 1, 2: day lily tubulin
lane 3: Standard markers

沉降系数的测定 纯化的微管蛋白溶液在 pH6.9, 0.1 mol L 磷酸缓冲液 (内含 0.1 mol L NaCl, 1 mmol L PMSF, 1 mmol L TPCK 和 1 mmol L TAME) 充分透析后浓缩至蛋白质浓度 0.34 mg ml, 55 000 r min 离心, 检测吸收峰。以吸收界面至转头中心距离的对数 ($\log r$) 对时间 (t) 作图 (图 3), 从所得直线求出斜率为 0.473159×10^{-3} , 代入公式: $S = 2.303 \cdot 60^{-2} \cdot (d \log dt)$, 式中 ω 为角速度 (弧度 秒), r 为轴心至沉降界面的距离 (cm), t 为时间 (秒)。

通过温度补偿校正计算出沉降系数 S_{20w} 为 6.2S, 比动物微管蛋白沉降系数 5.8 ~ 6S 略大一些, 这正好与 SDS-PAGE 所测定的植物微管蛋白分子量比动物微管蛋白分子量略大的结果相一致。

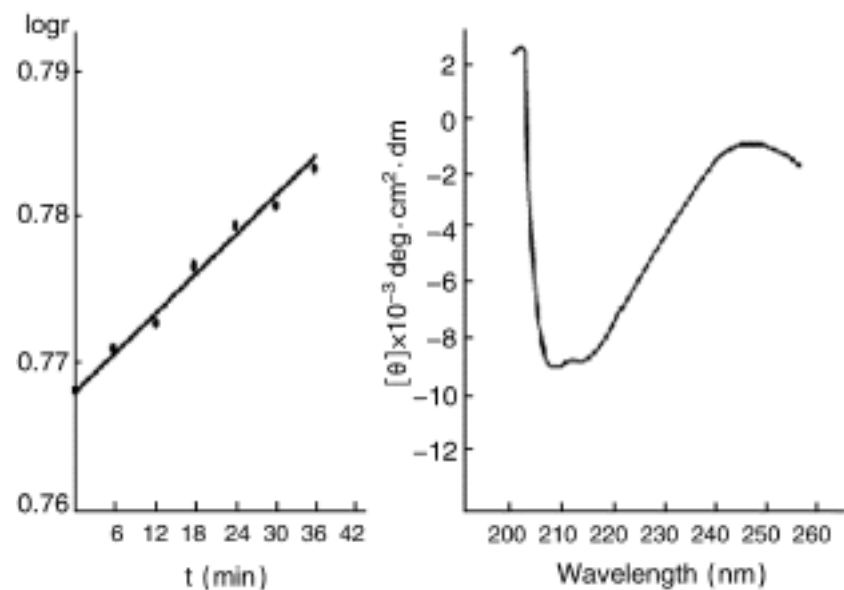


图3 微管蛋白沉降系数测定
Fig. 3 Sedimentation coefficient of day lily tubulin

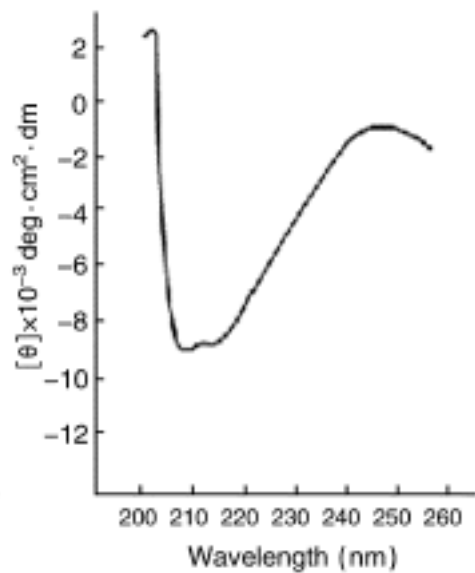


图4 微管蛋白圆二色谱图
Fig. 4 Circular dichroism spectrum of day lily tubulin

2.2 植物微管蛋白生物物理性质

2.2.1 圆二色谱的测定与二级结构的预测

一般认为, CD 光谱法 (Circular Dichroism Spectrum) 是测定生物大分子构象的手段, 可反映出非对称分子内部结构信息。当圆偏振光通过含有生物大分子物质的溶液时, 由于这些分子的不对称性及分子中发色团周围电荷分布的不对称性, 可使左、右的圆偏振光消光系数的差产生二色性。分子或分子中电荷分布越不对称, 这种差值就越大, 反映在 CD 光谱中的 $[\theta]$ 值越大, 所以远紫外区的圆二色性反映了蛋白质主肽链的构象。微管蛋白的远紫外区圆二色谱见图 4。微管蛋白在 208 nm, 215 nm 有二个平缓的负峰, 呈现出球蛋白的特征。根据 Chen (1974) 的方法, 从

圆二色光谱上计算出微管蛋白二级结构中的 α -螺旋, β -折叠, 无规卷曲的含量分别为 27.24%, 24.48% 和 48.28%。

2.2.2 紫外吸收光谱分析 萱草花粉微管蛋白的紫外最大吸收波长为 280.8 nm, 这主要是由色氨酸残基的吲哚环和酪氨酸残基的酚基所贡献的。

2.2.3 荧光光谱分析 荧光光谱是研究蛋白质结构和功能的一种重要手段, 一般可分为外源荧光和内源荧光, 内源荧光是指由蛋白质内色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等的荧光生色团产生的荧光。由于这些残基都是蛋白质的天然成分, 利用它们作为蛋白质内源的“报导”基团, 可以更加准确地反映出天然状态下蛋白质结构和功能的变化。花粉微管蛋白的荧光光谱分析见图 5。从图中可以看出, 最大荧光发射波长为 338 nm, 最适激发波长为 282 nm。表现了色氨酸与酪氨酸两者的荧光光谱特征。

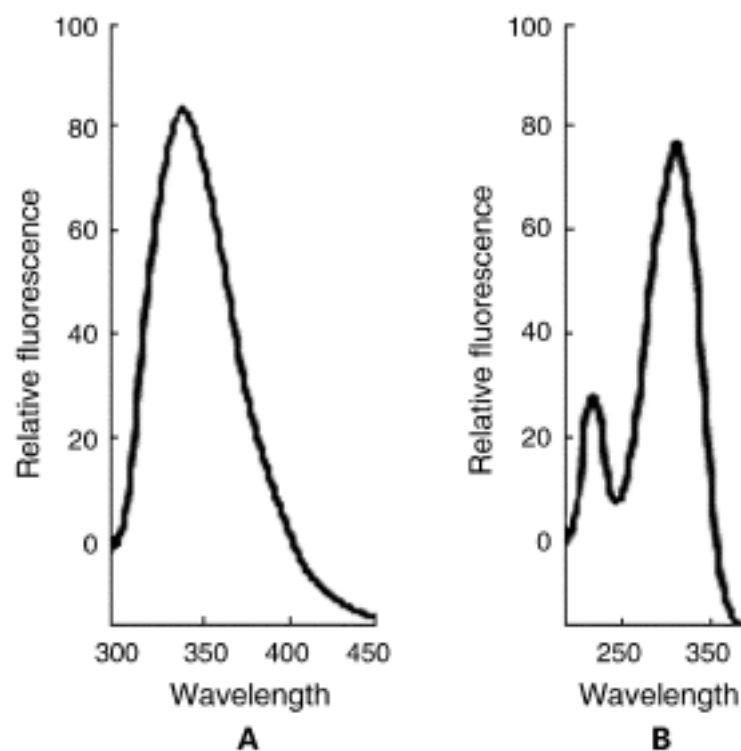


图5 萱草花粉蛋白荧光发射光谱

Fig. 5 Fluorescence emission spectrum of tubulin from day lily pollen
A: EX Spectrum B: EM Spectrum

3 讨论

与动物微管相比, 植物微管的研究是比较落后的, 主要原因就是难以制备足够量的微管蛋白及其相关蛋白。Morejohn 等 (1982, 1984) 从玉米、烟草、胡萝卜、玫瑰悬浮细胞中分离纯化得到微管蛋白, 并体外聚合成功。但有关植物微管蛋白的生化特征尚未见报道, 可能也是纯化的数量太少之故。而且悬浮细胞经过脱分化过程产

生, 能否代表正常的植物细胞尚待确定。我们选用干物质十分丰富, 微管蛋白含量较高的植物花粉作为材料并利用丙酮粉及 PVP 消除了氧化酶及次级代谢物的影响。利用该方法可以得到毫克级的电泳纯微管蛋白。

所有的微管都是由相似的蛋白亚基即 α -二聚体所组成, 在纯化过程中要维持 α -二聚体的稳定结构, 必须维持二硫键的稳定。否则得到的是单体的蛋白亚基。Oakley (1993), Stearns (1993) 等发现一种新的微管蛋白组分 β -微管蛋白, 占总微管蛋白含量的 1% 左右, 存在于中心粒或纺锤极体中, β -微管蛋白可能不直接参与微管结构的组成, 但可能对微管发生中的微管成核过程起作用。本试验中纯化的是 α -微管蛋白, 并未发现 β -微管蛋白, 可能是 β -微管蛋白含量太少的缘故。

微管的 α -微管蛋白亚基上含有一个不可交换的 GTP 结合位点, β 亚基上含有一个可交换的 GTP 结合位点, 而且这个可交换的 GTP 结合位点在 β -微管蛋白的氨基端随着微管的聚合它可被水解成 GDP, 为微管聚合提供能量, 所以在微管的内部, α 亚基都是结合 GDP 的 (Madelkow, 1994)。由于 GTP 在微管聚合时已经结合到微管蛋白上, 并起着稳定微管蛋白的作用, 所以按我们的纯化方法可以省去纯化过程中的 GTP, 大大降低了费用。鉴于微管蛋白是 GTP 结合蛋白并参与了信号传递, 表现了部分 G-蛋白的特征, 所以现在也把微管蛋白归为 G-蛋白家族中的一员 (Shivanna, 1993)。

植物微管与动物微管具有很大的可比性, 例如利用 Taxol 诱导, 动植物微管蛋白都可以聚合形成微管 (Bokros 等, 1993), 并且植物微管可以和神经系统中微管结合蛋白 MAPs 紧密地结合 (Hugdahl, 1993)。从我们得到的上述生化性质结果看, 无论从分子量 (图 1)、等电点 (图 2) 还是二级结构的成分预测 (图 3), 都与动物微管蛋白相似。天然梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分析及沉降系数的测定都表明植物微管蛋白的分子量比动物微管蛋白的分子量略大。我们纯化的微管蛋白在紫杉醇诱导下, 也成功地完成了体外聚合 (廖俊杰, 2005), 再次证明动植物微管蛋白有着相同的化学特性和聚合机制。这可能与微管蛋白

在进化上相对保守相符。

虽然我们通过圆二色谱的测定可以进行微管蛋白二级结构的预测, 通过紫外吸收光谱分析和荧光光谱分析可以推测微管蛋白内部含有色氨酸与酪氨酸残基, 呈现球蛋白特征。但有关微管蛋白的其它结构与功能仍有待更深入研究。

〔参 考 文 献〕

- Bradford MM, 1976 . A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J] . *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Bokros CL, Hugdahl JD, Hanesworth VR, *et al*, 1993 . Characterization of the reversible taxol induced polymerization of plant tubulin into microtubules [J] . *Biochemistry*, 32: 3437—3447
- Chen YH, Yang JT, Chen HK, 1974 . Determination of the helix - form proteins in a queous solution by circular dichvoism [J] . *Biochemistry*, 13: 3353—3359
- Hugdahl J, Bokros C, Hanesorth V, *et al*, 1993 . Unique functional characteristics of the polymerization and MAP linding regulatory domains of plant tubulin [J] . *Plant Cell*, 5: 1063—1080
- Laemmli UK, 1970 . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J] . *Nature*, 227: 680—685
- Liao JJ (廖俊杰), Wu YJ (吴英杰), Yan LF (阎隆飞), 2005 . Polymerziton and electron microscopy of tubulin of pollens from *Hemerocallis fulva* *In vitro* [J] . *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 27 (6): 649—652
- Mandelkow E, Mandelkow EM, 1994 . Microtubule structure [J] . *Curr Opin Struc Biol*, 4: 171—179
- Morejohn LC, Fosket DE, 1982 . Higher plant tubulin identified by self-assembly into microtubules *in vitro* [J] . *Nature*, 297: 426—428
- Morejohn LC, Bureau TE, Tocchi LP, *et al*, 1984 . Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 1440—1444
- Oakley BR, 1992 . Gamma tubulin: the microtubule organizer [J] . *Trends in Cell Biology*, 2: 1—5
- Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR, 1973 . Microtubule assembly in the absence of added nucleotides [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 70: 765—772
- Shivanna BD, Mejillano MR, Williams TD, *et al*, 1993 . Exchangeable GTP bing site of β -tubulin: identification of cysteine-12 as the major site of cross linking by direct photoaffinity labeling [J] . *J Bi-ol Chem*, 268: 127—132
- Stearns T, kirschner M, 1994 . *In vitro* reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of β -tubulin [J] . *Cell*, 76: 623—626